

氏 名	MOHAMMAD MAHBUB ISLAM
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第4011号
学位授与の日付	平成21年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Absciscic Acid- and Methyl Jasmonate-induced Cytosolic Alkalization in <i>Arabidopsis</i> Guard Cells (シロイヌナズナ孔辺細胞におけるアブシジン酸とジャスモン酸メチルが誘導する細胞内アルカリ化)
論文審査委員	教授 村田 芳行 准教授 中村 宜督 教授 木村 吉伸

### 学位論文内容の要旨

Stomata (singular, stoma) are small openings bounded pair of guard cells, is essential for plant survival in dry conditions. Both ABA and MeJA induce stomatal closure. Reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), cytosolic calcium ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ ), cytosolic pH ( $\text{pH}_{\text{cyt}}$ ) function as second messengers in ABA and MeJA signaling in guard cells. However, no report demonstrates whether  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  regulates  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  in ABA and MeJA signaling cascade in *Arabidopsis* guard cells.

In order to clarify whether  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  involves in cytosolic alkalization during stomatal closure. This study examined ABA- and MeJA-induced guard cell  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  through genetic and biochemical approach. Guard cells  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  were analyzed using a pH sensitive dye BCECF AM. ABA increased guard cells  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  in wild-type and *coi1* but not in *ost1-2* whereas MeJA elevated guard cells  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  in wild-type and *ost1-2* but not in *coi1*. Neither ABA nor MeJA change  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  in *abi1-1* and *abi2-1* guard cells. Similarly, external  $\text{Ca}^{2+}$  also increased  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  in all plants. Butyrate inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -induced stomatal closure and cytosolic alkalization in wild-type. These results suggest that ABA- and MeJA-induced guard cell cytosolic alkalization is mediated by  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  during stomatal closure in *Arabidopsis*.

Thioglucoside glucohydrolases (TGGs), *TGG1* and *TGG2* expressed in guard cells. This study also analyzes the effect ABA and MeJA on stomatal closure and effect of ABA on cytosolic alkalization of guard cells using *tgg* mutants. ABA increased  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  in plants but *tgg-3 tgg2-1* double mutant showed lower  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  than wild-type. Exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  increased  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  in all plants. The results of this study suggest that TGG1 and TGG2 redundantly function in response to ABA and MeJA and work downstream of ROS and NO production and upstream of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  elevation and cytosolic alkalization in ABA and MeJA signaling in *Arabidopsis* guard cells.

Elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , requires activation of  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channels on both plasma membrane and tonoplast. *Arabidopsis* Two Pore Channel 1 (AtTPC1) is a slow vacuolar channel. To investigate whether AtTPC1 is involved in stomatal closure and cytosolic alkalization with ABA and MeJA using *tpc1-2*. ABA and MeJA increased  $\text{pH}_{\text{cyt}}$  in guard cells of *tpc1-2* as wild-type which is consistent with their stomatal sensitivity.  $\text{Ca}^{2+}$  failed to induce stomatal closure and activated plasma membrane S-type anion currents, but  $\text{Ca}^{2+}$  elevated  $\text{pH}_{\text{cyt}}$ . These results suggest that AtTPC1 functions in response to  $\text{Ca}^{2+}$  but not to ABA and MeJA and that AtTPC1 is involved in priming of S-type anion channel by  $\text{Ca}^{2+}$  in guard cells. AtTPC1 does not contribute to guard cell alkalization in response to ABA, MeJA, and  $\text{Ca}^{2+}$  in *Arabidopsis*.

## 論文審査結果の要旨

本論文は、陸上植物にとって重要な生理的現象であるアブシジン酸とジャスモン酸メチルが誘導する気孔閉口において、孔辺細胞内のアルカリ化がシグナル伝達経路のどこでどのように機能しているかについて、シロイヌナズナを用いて明らかにしようとしたものである。

初めに、アブシジン酸とジャスモン酸メチルが誘導する気孔閉口において、孔辺細胞内のアルカリ化がカルシウムオシレーションよりも下流で起き、また、このオシレーションをフィードバック制御していることを明らかにした。

次に、新規に見つかったアブシジン酸、ジャスモン酸メチル非感受性変異株でミロシナーゼ変異株 (*tgg1 tgg2*) ジャスモン酸メチル非感受性変異株 *coi1* 変異体を用いて、細胞内アルカリ化について調査した。ミロシナーゼ変異によって、細胞内アルカリ化は完全に阻害され、これらホルモンシグナリングの比較的下流で機能していることが明らかになった。

さらに、孔辺細胞の液胞に発現するイオンチャネル TPC1 は、SV チャネルとして、細胞内のカルシウム動員に寄与していることが示唆されていたが、本研究より、孔辺細胞のカルシウムオシレーションとアルカリ化には、ほとんど寄与していないことを明らかにした。

以上の結果から、アブシジン酸とジャスモン酸メチルが誘導する気孔閉口には、細胞内アルカリ化が不可欠であり、また、細胞内カルシウムオシレーションより下流で機能し、また、カルシウムオシレーションに対してポジティブフィードバック制御を行なっていることを明らかにした。

本研究内容は、学術的な価値のみならず、気孔運動に着目した生産制御のための技術の基礎となるものである。従って、本審査委員会は本論文が博士（学術）の学位論文に値すると判断した。